 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2015.11.16 J South Med Univ, 2015, 35(11): 1602-1605

基础研究

精氨酸抗利尿激素对急性肺损伤大鼠肺水肿液的清除作用

邓 旺,王导新
重庆医科大学附属第二医院呼吸内科,重庆 400010

摘要:目的 探讨精氨酸抗利尿激素(AVP)对急性肺损伤肺水肿液清除作用。**方法** 48只健康成年的雄性SD大鼠随机分为对照组、模型组(ALI组)、AVP组,观察各组肺组织病理形态学、肺水含量、肺泡上皮通透性及肺泡液体清除率(AFC)变化,测定肺泡上皮钠通道(ENaC)和钠/钾ATP酶(Na^+, K^+-ATPase)表达情况。**结果** 经AVP治疗后,模型组肺泡上皮通透性(0.27±0.15 *vs* 0.59±0.19)及肺水含量(5.01±1.59 *vs* 8.67±1.79)减轻,AFC增加(23.56±4.51 *vs* 8.28±3.57),α-ENaC(1.296±0.322 *vs* 0.349±0.141)和α_1-Na^+,K^+-ATPase表达增加(1.421±0.389 *vs* 0.338±0.186),均有显著差异($P<0.05$)。**结论** AVP能促进AFC,其作用途径可能是上调α-ENaC和α_1-Na^+,K^+-ATPase通道蛋白实现的。

关键词:精氨酸抗利尿激素;上皮钠通道;钠/钾ATP酶;急性肺损伤;肺泡液体清除

Effect of arginine vasopressin on alveolar fluid clearance in rats with acute lung injury

DENG Wang, WANG Daoxin
Department of Respiratory Medicine, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

Abstract: Objective To investigate the effect of arginine vasopressin (AVP) on alveolar fluid clearance (AFC) in acute lung injury (ALI). **Methods** Forty-eight healthy adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group, ALI model group and AVP treatment group. The pathological changes in the lungs, lung water content, alveolar permeability and AFC were observed, and the expressions of alveolar epithelial sodium channel (ENaC) and Na^+, K^+-ATPase were measured. **Results** Compared with those in the model group, the rats treated with AVP showed significantly decreased alveolar permeability (0.27±0.15 *vs* 0.59±0.19) and lung water content (5.01±1.59 *vs* 8.67±1.79) ($P<0.05$) and increased AFC (23.56±4.51 *vs* 8.28±3.57) and of α-ENaC expressions (1.296+0.322 *vs* 0.349±0.141) and α_1-Na^+, K^+-ATPase (1.421±0.389 *vs* 0.338±0.186) ($P<0.05$). **Conclusion** AVP can promote AFC in with ALI possibly by up-regulation of α-ENaC, α_1-Na^+, and K^+-ATPase.

Key words: arginine vasopressin; epithelial sodium channel; Na^+, K^+-ATPase; acute lung injury; alveolar fluid clearance

急性肺损伤(ALI)由于多种病因导致毛细血管-肺泡上皮屏障损害,大量富含蛋白的水肿液聚集在肺泡腔内,从而使正常的气体交换障碍。急性呼吸窘迫综合症(ARDS),是ALI进行性发展的严重阶段,病死率高达40%[1]。有效地清除肺泡腔内聚集过多的水肿液是判断ALI/ARDS预后的重要因素[2]。新近研究发现精氨酸抗利尿激素(AVP)能减轻ALI/ARDS肺部炎症反应,同时在肺水肿液重吸收中扮演着重要角色[3-6],但对肺水含量的影响及作用机制尚不清楚。

目前研究认为肺泡上皮钠通道(ENaC)和Na^+,K^+-ATPase是肺泡腔内钠水转运的重要环节,能有效地清除聚集的水肿液,对维持气体交换和改善氧合至关重要,其中以α-ENaC和α_1-Na^+,K^+-ATPase为关键通道蛋白[7]。本研究通过大鼠ALI模型,观察精氨酸抗利尿激素对肺水肿液清除的影响并探讨其可能机制。

收稿日期:2015-06-21
基金项目:国家自然科学基金(81270141)
Supported by National Natural Science Foundation of China (81270141).
作者简介:邓 旺,医师,E-mail: bsb_dw@163.com
通信作者:王导新,博士,主任医师,教授,博士生导师,电话:023-63693094,E-mail: wangdaoxin1@163.com

1 材料和方法

1.1 动物和主要试剂

健康成年的雄性SD大鼠48只(SPF级),体质量300±25 g,由重庆医科大学动物实验中心提供,许可证号:SCXK(渝)2007-0001。精氨酸抗利尿激素(AVP)购自American Regent公司。脂多糖(LPS,*E.coli*,0111:B4)、戊巴比妥、Evans-blue购自Sigma公司。蛋白检测试剂购自南京凯基。α_1-钠/钾ATP酶(α_1-Na^+,K^+-ATPase)单克隆抗体购自Millipore公司。α-ENaC及β-肌动蛋白(β-actin)单克隆抗体购自Santa Cruz公司。

1.2 模型建立和分组给药

给予大鼠腹腔注射戊巴比妥50 $mg\cdot kg^{-1}$麻醉后,至于解剖台上,逐层解剖分离,暴露右侧颈静脉,留置静脉插管。LPS以5 $mg\cdot kg^{-1}$剂量通过颈静脉插管注入[8]。48只SD大鼠随机分为对照组:通过微量泵经颈静脉泵入等量生理盐水;模型组:建立ALI模型,建模1 h后泵

入等量生理盐水；AVP组：ALI模型建立1 h后持续泵入AVP 0.57 mU·kg^{-1}·min^{-1}。每组16只。每组大鼠在建立模型12 h后通过颈椎脱臼，断开脊髓处死，并收集标本。

1.3 肺组织病理学检查

大鼠处死后，取左肺上叶组织，置于10%甲醛溶液中固定后，石蜡包埋组织，苏木素-伊红（HE）染色，观察病理学改变。

1.4 肺水含量测定

取左肺下叶组织，称湿重后置于80 ℃烤箱中烘烤72 h，然后再称干重，计算肺湿/干重比，评估肺水含量。

1.5 肺泡上皮通透性测定

结扎右侧主支气管，游离右肺组织，在室温下用接注射器的灌洗器通过左侧支气管向左肺组织注入0.9%生理盐水5 mL，反复抽吸3次后吸出，重复3次，置于4 ℃离心机上14 000 r/min离心30 min，取上清液保存。从静脉导管收集血标本，置于4 ℃离心机上1500 r/min离心20 min。依据蛋白检测试剂盒说明书测定支气管肺泡灌洗液（BALF)）和血浆中蛋白含量，计算BALF/血浆蛋白比值，评估肺泡上皮通透性[9]。

1.6 肺泡液体清除率（AFC）

参照文献[10]的方法进行AFC测定。游离右肺组织并行气管插管，然后注入100%氮气，将含0.15 mg·mL^{-1} Evans-blue标记的5%白蛋白等渗生理盐水（5 mL·kg^{-1}）经导管灌入大鼠左肺组织，机械通气1 h后测定肺泡内液体Evans-blue标记的白蛋白浓度，根据公式：AFC=[(Vi-Vf)/Vi]×100%，Vf=(Vi×Pi)/Pf。Vi：起始注入肺泡内液体量，Vf：最后肺泡内液体量，Pi：起始注入的Evans-blue标记的白蛋白浓度，Pf：最后Evans-blue标记的白蛋白浓度。

1.7 免疫组织化学

取左肺下叶组织，石蜡包块，切片后先后依次置于二甲苯，不同浓度的乙醇及3% H_2O_2，室温下孵育10 min；蒸馏水冲洗后，PBS浸泡6 min；牛血清室温封闭30 min；4 ℃与稀释的一抗（α_1-Na^+, K^+-ATPase, α-ENaC）孵育过夜；PBS冲洗3次后，与生物素标记的二抗37 ℃孵育30 min；然后再与辣根酶标记抗生物素蛋白复合物反应30 min；DBA显色，苏木素复染，中性树胶封片。在高倍镜下随机选取5个视野观察，褐色颗粒为阳性结果，计算每个视野中阳性细胞数。

1.8 免疫蛋白印迹（Western blot）

提取的组织蛋白样品经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分离后，转移至硝酸纤维素膜上。脱脂奶粉封闭1 h后，分别与α-ENaC（1∶300）、α_1-Na^+，K^+-ATPase（1∶500）、β-actin（1∶2000）反应，4 ℃孵育过夜。TBST洗膜3次后，再与辣根过氧化物酶标记的IgG反应，室温孵育2 h，ECL显色。BIO-RAD成像系统扫描，Quantity One软件分析条带吸光度值，以目的条带与β-actin比值作为结果进行比较。

1.9 统计学分析

所有数据以均数+标准差表示，运用SPSS13.0统计软件进行单因素方差分析或者student's-*t*检验，$P<0.05$为差异具有显著性。

2 结果

2.1 肺组织病理变化

对照组为正常肺组织，未见明显的肺泡及间质水肿和炎性细胞浸润。与对照组比较，模型组肺泡及间质水肿，炎性细胞浸润，肺泡结构破坏、出血，透明膜形成。与模型组比较，AVP组肺泡及间质水肿显著减轻，出血及肺泡结构破坏减轻，炎性细胞浸润减少，未见透明膜形成（图1）。

2.2 肺水含量和肺泡上皮通透性

与对照组比较，模型组肺水含量和肺泡上皮通透性显著增加（$P<0.05$）；AVP治疗后肺水含量和肺泡上皮通透性显著降低（$P<0.05$，表1）。

2.3 肺泡液体清除率

与对照组比较，模型组AFC显著降低52.9%（$P<0.05$）；AVP治疗后，AFC显著增加187%（$P<0.05$，表1）。

2.4 免疫组织化学检测肺组织α-ENaC和α_1-Na^+，K^+-ATPase的表达

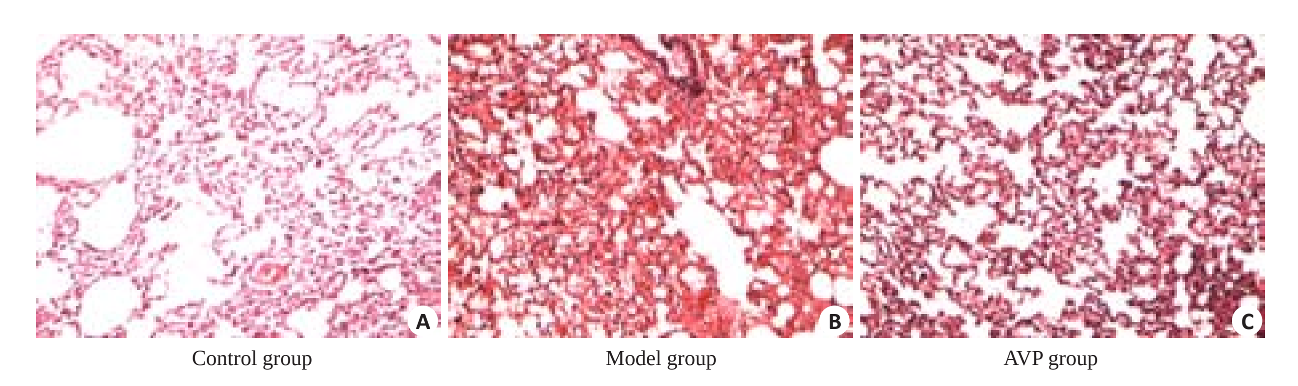


图1 各组大鼠肺组织病理学

Fig.1 Histological changes of the lung in each group(HE, original magnification: ×10).

表1 肺水含量和肺泡上皮通透性

Tab.1 Lung water content and alveolar permeability in each group (*Mean*±*SD*, *n*=8)

Group	Wet/dry ratio	BALF/plasma protein ratio	AFC(%)
Control group	2.36±0.64	0.05±0.02	17.79±2.55
Model group	8.67±1.79*	0.59±0.19*	8.28±3.57*
AVP group	5.01±1.59#	0.27±0.15#	23.56±4.51#

*P<0.05 *vs* control group; #P<0.05 *vs* model group.

与对照组比较，模型组α-ENaC和α_1-Na^+，K^+-ATPase的表达显著降低(P<0.05)；AVP治疗后，α-ENaC和α_1-Na^+，K^+-ATPase的表达显著增加(P<0.05，图2，表2)。

α-ENaC　　α_1-Na^+, K^+-ATPase

A

B

C

图2 免疫组织化学法检测各组肺组织α-ENaC和α_1-Na^+, K^+-ATPase的表达

Fig.2 Immunocytochemical detection of the expressions of α-ENaC and α_1-Na^+, K^+-ATPase in the lungs in each group. *A*: Control group; *B*: Model group; *C*: AVP group.

2.5 Western blot法检测肺组织α-ENaC和α_1-Na^+，K^+-ATPase的表达

与对照组比较，模型组α-ENaC和α1-Na^+，K^+-ATPase的表达显著降低(P<0.05)；AVP治疗后，α-ENaC和α_1-Na^+，K^+-ATPase的表达显著增加(P<0.05，图3，表2)。

3 讨论

ALI/ARDS因肺泡腔内过多的水肿液聚集，含水量为正常的3~4倍，从而导致气体交换障碍，引起顽固性低氧血症。研究发现有效地清除肺泡腔内过多的水肿液，对维持气体交换和改善患者氧合至关重要，可明显降低ARDS患者的病死率[11]。AVP作为一种较为特殊的血管活性激素，其特点是舒张肺血管和收缩全身血管。在脓毒血症导致的急性肺损伤患者中AVP水平异常降低，并且给予外源性AVP治疗后能恢复血管活性，减轻肺组织炎症[4-5]。新近研究发现AVP通过促进上皮钠通道转运的途径减轻了慢性心衰导致的肺水肿，发挥了关键作用[12]。因此，本研究试图通过建立大鼠ALI模型，探讨AVP对肺水肿液清除的作用机制。

LPS通过激活巨噬细胞产生炎性介质，在肺毛细血管处聚集了大量中性粒细胞，损伤肺泡-毛细血管屏障，导致肺泡及间质水肿，模拟了ALI/ARDS的表现[13]。本研究中，通过LPS建立ALI的动物模型发现，肺泡及间质水肿，炎性细胞浸润，肺泡结构破坏、出血，透明膜形成，同时肺水含量和肺泡上皮通透性显著增加。经过AVP治疗后，肺水含量和肺泡上皮通透性显著降低，肺损伤程度也明显减轻。

ENaC存在于肺泡上皮细胞顶膜，是完成肺泡腔内钠离子跨膜转运的限速步骤和提供AFC的源动力，同时与位于细胞底膜的Na^+，K^+-ATPase共同完成钠水转运过程，在AFC中发挥十分重要的主导作用；其中，α-ENaC和α_1-Na^+，K^+-ATPase是发挥肺水肿液清除的关键通道蛋白[7, 14-15]。本研究中，ALI模型组α-ENaC和α_1- Na^+，K^+-ATPase表达显著降低，AFC明显减少，肺水肿程度加重。同时经AVP治疗后，与模型组比较，AFC明显增加，肺水肿减

表2 肺组织α-ENaC和α_1- Na^+,K^+-ATPase的表达

Tab.2 The expressions of α-ENaC and α_1-Na^+, K^+-ATPase (*Mean*±*SD*, *n*=8)

Group	Immunohistochemistry		Western blot	
	α-ENaC	α_1- Na^+, K^+-ATPase	α-ENaC	α_1- Na^+, K^+-ATPase
Control	8.75±3.45	7.63±3.89	0.806±0.125	0.751±0.145
Model	2.88±2.42*	2.50±1.60*	0.349±0.141 *	0.338±0.186 *
AVP	24.13±7.06#	21.25±6.48#	1.296±0.322#	1.421±0.389#

*P<0.05 *vs* Control group; #P<0.05 *vs* Model group.

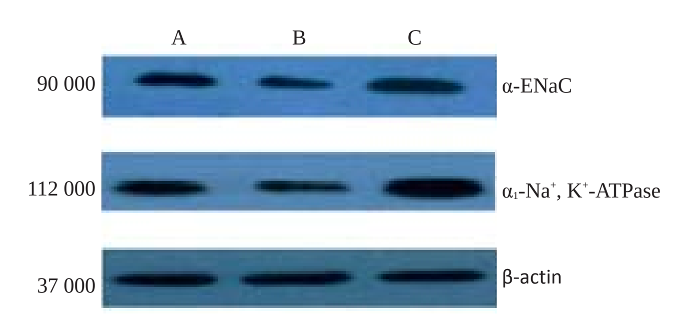


图3 Western blot法检测肺组织α-ENaC和α_1-Na^+,K^+-ATPase的表达

Fig.3 Expressions of α-ENaC and α_1-Na^+, K^+-ATPase in the lungs of the rats detected by Western blotting. ***A***: Control group; ***B***: Model group; ***C***: AVP group.

轻,肺损伤程度也明显减轻,这与Ji等[3]研究结果一致。但本实验通过进一步探讨AVP对α-ENaC和α_1-Na^+,K^+-ATPase的作用发现,与模型组比较,AVP治疗后使AFC增加,促进钠水转运,从而减轻肺水肿的机制是通过上调α-ENaC和α_1-Na^+,K^+-ATPase的表达实现的,从而有益于肺泡腔的气体交换,改善氧合,提示了AVP在ALI中促进肺水肿液清除的可能机制,这在国内外同类研究中报道甚少。

综上所述,AVP可以有效促进ALI时肺泡腔内过多的水肿液清除,从而减轻肺水含量,其作用途径可能是上调α-ENaC和α_1-Na^+,K^+-ATPase通道蛋白实现的,为临床治疗提供了理论依据。

参考文献:

[1] Villar J, Sulemanji D, Kacmarek RM. The acute respiratory distress syndrome: incidence and mortality, has it changed?[J]. Curr Opin Crit Care, 2014, 20(1): 3-9.

[2] Hollenhorst MI, Richter K, Fronius M. Ion transport by pulmonary epithelia[J]. J Biomed Biotechnol, 2011: 174306.

[3] Ji M, Li R, Li GM, et al. Effects of combined levosimendan and vasopressin on pulmonary function in porcine septic shock [J]. Inflammation, 2012, 35(3): 871-80.

[4] Boyd JH, Holmes CL, Wang Y, et al. Vasopressin decreases sepsis-induced pulmonary inflammation through the V2R [J]. Resuscitation, 2008, 79(2): 325-31.

[5] Westphal M, Rehberg S, Maybauer MO, et al. Cardiopulmonary effects of low-dose arginine vasopressin in ovine acute lung injury [J]. Crit Care Med, 2011, 39(2): 357-63.

[6] Perks AM, Cassin S. The effects of arginine vasopressin and epinephrine on lung liquid production in fetal goats [J]. Can J Physiol Pharmacol, 1989, 67(5): 491-8.

[7] Soukup B, Benjamin A, Orogo-Wenn M, et al. Physiological effect of protein kinase C on ENaC-mediated lung liquid regulation in the adult rat lung[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 302 (1): L133-9.

[8] Rojas M, Woods CR, Mora AL, et al. Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288(2): L333-41.

[9] Magnotti LJ, Upperman JS, Xu DZ, et al. Gut-derived mesenteric lymph but not portal blood increases endothelial cell permeability and promotes lung injury after hemorrhagic shock [J]. Ann Surg, 1998, 228(4): 518-27.

[10] Deng W, Li CY, Tong J, et al. Regulation of ENaC-mediated alveolar fluid clearance by insulin via PI3K/Akt pathway in LPS-induced acute lung injury[J]. Respir Res, 2012, 13(1): 29.

[11] Herold S, Gabrielli NM, Vadász I. Novel concepts of acute lung injury and alveolar-capillary barrier dysfunction [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013, 305(10): L665-81.

[12] Guetta J, Klorin G, Tal R, et al. Vasopressin-2 receptor antagonist attenuates the ability of the lungs to clear edema in an experimental model[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012, 47(5): 583-8.

[13] Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive Oxygen and Nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function [J]. Free Radic Biol Med, 2007, 42(2): 153-64.

[14] 赵 燕, 何 婧, 管 弦, 等. 黄芪注射液对急性肺损伤小鼠钠通道表达的影响[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(11): 1603-5, 1609.

[15] Lazrak A, Chen L, Jurkuvenaite A, et al. Regulation of alveolar epithelial Na^+ channels by ERK1/2 in chlorine-breathing mice [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012, 46(3): 342-54.

(编辑:吴锦雅)